

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 09-077653

(43)Date of publication of application : 25.03.1997

(51)Int.Cl.

A61K 7/48
A61K 7/00
A61K 7/42

(21)Application number : 07-260982

(71)Applicant : ADVANCE CO LTD

(22)Date of filing : 14.09.1995

(72)Inventor : URAKABE NOBUKANE
OKABE KEIICHIRO

(54) COSMETIC

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain a cosmetic effective for the normalization of skin and the prevention of skin injury caused by active oxygen or ultraviolet rays.

SOLUTION: This cosmetic contains 0.01-50wt% each of one or more factors or components selected from among an indigenous skin bacterium proliferation factor (e.g. essential amino acid), a factor inhibiting the growth of harmful skin bacterium (e.g. higher fatty acid) and a nutrient source of indigenous skin bacterium (e.g. skin or sweat component). The essential amino acid is arginine, isoleucine, leucine, methionine, phenylalanine, proline, tryptophan, tyrosine and valine, the higher fatty acid as the proliferation factor is stearic acid and oleic acid, the higher fatty acid as the growth inhibiting factor is lauric acid, myristic acid, palmitoleic acid, linoleic acid, linolenic acid, arachidic acid and arachidonic acid, the sebum component is triglyceride, wax ester, squalene, cholesterol ester and cholesterol and the sweat component is water, chlorine, Na, K, Ca, Mg, N, ammonia, glucose and lactic acid.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2000 Japan Patent Office

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平9-77653

(43) 公開日 平成9年(1997) 3月25日

(51) Int.Cl. ⁹	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
A 6 1 K	7/48		A 6 1 K	7/48
	7/00			7/00
				C
				K
				W
	7/42		7/42	
審査請求 未請求 請求項の数9 F D (全 14 頁)				

(21) 出願番号 特願平7-260982

(22) 出願日 平成7年(1995) 9月14日

(71) 出願人 000126757

株式会社アドバンス

東京都中央区日本橋小舟町5番7号

(72) 発明者 浦壁 伸周

東京都江東区北砂3-4-8

(72) 発明者 岡部 敬一郎

東京都世田谷区成城8-30-28

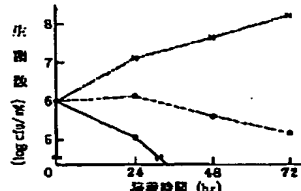
(54) 【発明の名称】 化粧品

(57) 【要約】

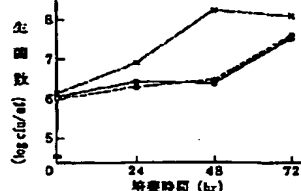
【目的】 皮膚常在細菌増殖因子を含有する化粧料を提供する。

【構成】 皮膚常在細菌増殖因子として皮膚常在細菌の必須アミノ酸及至高級脂肪酸及至栄養源を含有し、更に皮膚有害細菌の生育阻害因子を含有する。

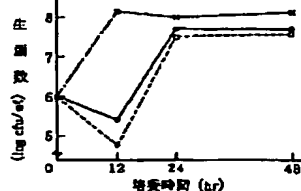
ケラチンあるいはオリーブオイル添加培養地の皮膚常在細菌増殖結果
プロビオニバクテリウム・アクネス ATCC11827



プロビオニバクテリウム・グラニューラム RM48



スタフィロコッカス・エピデルミディス Y067



培養地成分 (g/l): トリブチケース(1), イーストエキス(0.2), グルコース(2), NaCl(2.5), NaH_2PO_4 (3), K_2HPO_4 (7), フェーン80(2), システイン塩酸塩(0.2), pH 6.5

【特許請求の範囲】

【請求項1】 皮膚常在細菌の増殖因子として、皮膚常在細菌の必須アミノ酸を含有することを特徴とする化粧料。

【請求項2】 前記増殖因子としての皮膚常在細菌の必須アミノ酸が、アルギニン、イソロイシン、ロイシン、メチオニン、フェニルアラニン、プロリン、トリプトファン、チロシン、バリンであることを特徴とする請求項1の化粧料。

【請求項3】 皮膚常在細菌の増殖因子として、高級脂肪酸を含有することを特徴とする化粧料。

【請求項4】 前記増殖因子としての高級脂肪酸が、ステアリン酸、オレイン酸であることを特徴とする請求項3の化粧料。

【請求項5】 皮膚有害細菌の生育を阻害する高級脂肪酸を含有することを特徴とする化粧料。

【請求項6】 前記生育阻害因子としての高級脂肪酸がラウリン酸、ミリスチン酸、パルミトレイン酸、リノール酸、リノレン酸、アラキジン酸、アラキドン酸であることを特徴とする請求項5の化粧料。

【請求項7】 皮膚常在細菌の栄養源として皮脂及至汗の成分を含有することを特徴とする化粧料。

【請求項8】 前記皮膚常在細菌の栄養源としての皮脂の成分がトリグリセリド、ワックスエステル、スクワレン、コレステロールエステル、コレステロールで、および汗の成分が水、塩素、ナトリウム、カリウム、カルシウム、マグネシウム、窒素、アンモニア、ブドウ糖、乳酸であることを特徴とする請求項7の化粧料。

【請求項9】 請求項2、請求項4、請求項6および請求項8記載の因子又は成分を1種又は2種以上含有することを特徴とする化粧料。

【発明の詳細な説明】**【0001】**

【産業上の利用分野】本発明は皮膚常在細菌の増殖因子、皮膚有害細菌の生育阻害因子、皮膚常在細菌の栄養源を1種又は2種以上を含有してなる、ヒトの皮膚の正常化、および活性酸素や紫外線による障害防御等に有効な化粧料に関する。

【0002】

【従来の技術】従来から皮膚の乾燥や肌荒れの防止又は改善、及び活性酸素や紫外線による障害防御を目的とした化粧料については、クリーム等のヒト皮脂膜の有する皮膚保護作用・自浄作用等を模倣するもの、天然物から抽出した原料を含有する皮膚賦活作用を有するもの、紫外線を反射又は吸収する素材を含有する紫外線による障害から皮膚を防御するもの等が盛んに用いられ今日に至っている。

【0003】しかしながら、人工的に組成された化粧料は皮膚の自然な機能によって組成されるものには到底及び得ないものであり、さらにヒトの皮膚には普通肌、脂

性肌、乾燥型脂性肌、乾性肌の4タイプがあり、それぞれのタイプによって皮膚の乾燥や肌荒れの防止法及び改善法は異なってくる。

【0004】また、活性酸素や紫外線による障害防御を目的として人工的に組成された化粧料は、その作用時間が限られてしまう。

【0005】さらに、人工的に組成された化粧料は、皮膚の自然な機能によって組成される状況に比較すると、その安全性の面で多くの問題点を有している。

【0006】従って従来の化粧料は、皮膚の正常化、及び活性酸素や紫外線による障害防御等に対して広範囲な効果と安全性を期待することができないという欠点を有していた。

【0007】

【発明が解決しようとする課題】そこで、本発明者等は上記した状況を鑑み、皮膚の正常化、及び活性酸素や紫外線による障害防御等に対して広範囲な効果がある方法について鋭意研究を重ねた結果、皮膚常在細菌叢の状態を正常化し、さらに活性化することが重要な要件であることを解明した。

【0008】さらにその具体的な方法として、皮膚常在細菌の増殖因子、皮膚有害細菌の生育阻害因子、及び皮膚常在細菌の栄養源の中から選ばれた1種又は2種以上の因子又は成分を含有する組成物を皮膚に散布又は塗布することによって、皮膚の正常化、及び活性酸素や紫外線による障害防御に対して著しい効果を示すことを認め、本発明を完成するに至った。

【0009】

【課題を解決するための手段】本発明は、自然皮脂膜の本体は、皮膚常在細菌とその代謝産物に他ならないこと、また皮膚常在細菌は皮膚表層に発生する活性酸素や紫外線による障害を防御していること等に着目し、皮膚常在細菌の増殖因子、皮膚有害細菌の生育阻害因子、皮膚常在細菌の栄養源の中から選ばれた1種又は2種以上の因子又は成分を含有する化粧品を提供することにより上記課題を解決したものである。

【0010】すなわち、本発明化粧料は、プロピオニバクテリウム・アクネス(*Propionibacterium acnes*)やスタフィロコッカス・エピデルミディス(*Staphylococcus epidermidis*)等の皮膚常在細菌の増殖因子としての必須アミノ酸である、アルギニン、イソロイシン、ロイシン、メチオニン、フェニルアラニン、プロリン、トリプトファン、チロシン、バリン、及び高級脂肪酸であるステアリン酸、オレイン酸を1種又は2種以上含有することを特徴とするものである。

【0011】また、本発明化粧料は、スタフィロコッカス・アウレウス(*Staphylococcus aureus*)等の皮膚有害細菌の生育阻害因子としての高級脂肪酸である、ラウリン酸、ミリスチン酸、パルミトレイン酸、リノール酸、リノレン酸、アラキジン酸、アラキドン酸を1種又は2

3

種以上含有することを特徴とするものである。

【0012】さらには、本発明化粧料は、皮膚常在細菌の栄養源として皮脂及至汗に含まれる成分を1種又は2種以上含有することを特徴とするものである。

【0013】以下、本発明の詳細な説明を順次述べる。本発明者等は、男女各年齢層について皮膚常在細菌の数量と種類、皮膚表層の成分、皮膚の生理的・生化学的狀態等について鋭意研究を行い、その結果として以下のことを解明した。

【0014】ヒトの皮膚表層には代表的な細菌として、プロピオニバクテリウム・アクネスとスタフィロコッカス・エピデルミディスが常在し、その平均的な数量は、皮膚1cm²あたりプロピオニバクテリウム・アクネスは数万個から数十万個、スタフィロコッカス・エピデルミディスは数百から数千個に及ぶことが判明した。

【0015】この皮膚常在細菌は、皮膚表層に分泌又は存在する皮脂や汗、脂質・蛋白質・糖質等の物質を栄養源にして生育し、増殖を繰り返している。

【0016】この時、皮膚常在細菌は多種多様な代謝産物をつくり出し、皮脂腺から分泌される皮脂と汗腺から分泌される汗が乳化したものと共に皮膚の乾燥や炎症を防ぎ、活性酸素や紫外線による障害を防御し、さらには皮膚有害細菌の生育を阻害する層（以下「皮脂層」という）を形成することを見いだした。

【0017】この皮膚常在細菌、皮膚常在細菌の代謝産物、及び皮膚表層に存在又は分泌される物質によって構成される「皮脂層」に関して、解明した主要な働きを以下に述べる。

【0018】①皮脂と汗が乳化したものと皮膚常在細菌の代謝産物は皮膚からの水分の蒸散を抑制することによって皮膚を乾燥から守っている。②絶えず外部から加わる化学的・物理的な障害に対してバリア層として働き、皮膚を炎症や損傷から守っている。③皮膚常在細菌が産生するスーパーオキシドディスムターゼ（SOD）やカタラーゼ等の酵素は活性酸素の酸化力を消失させることによって皮膚を障害から守っている。④皮膚常在細菌は直接紫外線を吸収することによって、皮膚を紫外線による障害から守っている。⑤皮膚常在細菌が脂質を代謝することによって産生する遊離脂肪酸が、主に皮膚表層のpHを弱酸性（pH6前後）に維持し、皮膚有害細菌の生育を阻害することによって皮膚の清浄化に関与している、等である。

【0019】しかしながら、男女各年齢層のデータを比較検討した結果、皮膚を健全に維持する「皮脂層」を構成する皮膚常在細菌の数量と皮膚表層における皮脂や汗の分泌量が増加に伴って減少し「皮脂層」が劣化していくこと、皮膚有害細菌等が増殖して皮膚細菌叢の健全なバランスが崩れていくこと等が判明した。

【0020】そこで、減少する皮膚常在細菌の増殖因子と皮膚有害細菌の生育阻害因子、さらには同じく減少す

4

る皮脂と汗の成分の中から選ばれた1種又は2種以上を化粧料に配合して、これを散布又は塗布すると、肌荒れや炎症が緩和し、美しく健全な肌に改善されることを見だし、本発明を完成するに至ったのである。

【0021】皮膚常在細菌の増殖因子の化粧料に対する添加比率（重量%）は、健全な皮膚の表層に存在するアミノ酸及び高級脂肪酸の自然な組成に準ずるものであるが、通常下記のとおりである。

【0022】皮膚常在細菌の増殖因子である必須アミノ酸（アルギニン、イソロイシン、ロイシン、メチオニン、フェニルアラニン、プロリン、トリプトファン、チロシン、バリン）については、それぞれ0.01～10重量%（更に好ましくは0.05～1重量%）で、特に、皮膚常在細菌の増殖因子である必須アミノ酸群としては、トリプトファンを除く全ての必須アミノ酸をバランスよく含有するケラチン等を使用することができる。ケラチンを使用する場合は0.01～50重量%（更に好ましくは0.5～10重量%）。

【0023】皮膚常在細菌の増殖因子である高級脂肪酸（ステアリン酸、オレイン酸）は、それぞれ0.01～50重量%（更に好ましくは0.5～10重量%）。

【0024】皮膚有害細菌の生育阻害因子の化粧料に対する添加比率（重量%）は、健全な皮膚の表層に存在する高級脂肪酸の自然な組成に準ずるものであるが、通常下記のとおりである。高級脂肪酸（ラウリン酸、ミリスチン酸、パルミトレイン酸、リノール酸、リノレン酸、アラキジン酸、アラキドン酸）は、それぞれ0.01～50重量%（更に好ましくは0.5～10重量%）。

【0025】皮膚常在細菌の栄養源としての皮脂及び汗の成分の化粧料に対する添加比率（重量%）は、健全な皮膚の表層に存在する皮脂及び汗の成分の自然な組成に準ずるものであるが、通常下記のとおりである。

【0026】皮脂の成分（トリグリセリド、ワックスエステル、スクワレン、コレステロールエステル、コレステロール）は、それぞれ0.01～50重量%（更に好ましくは0.5～10重量%）。

【0027】汗の成分（水、塩素、ナトリウム、カリウム、カルシウム、マグネシウム、窒素、アンモニア、ブドウ糖、乳酸）は、それぞれ0.001～5重量%（更に好ましくは0.05～2重量%）。

【0028】尚、以上の因子又は成分は日本薬局方及至化粧品原料基準に記載されているので、品質・規格等はこれらに準ずる。

【0029】本発明化粧料は、本発明の効果を損ねない範囲で上記因子又は成分以外の任意の成分を配合することができ、その剤型に応じて化粧料に通常配合される成分、例えばエタノール、油性成分、保湿剤、増粘剤、防腐剤、乳化剤、薬効成分、粉体、香料、乳化安定剤、pH調整剤等を配合することができる。

50

【0030】具体的には、油性成分としては流動パラフィン、ワセリン、パラフィンワックス、スクワラン、ミツロウ、カルナウバロウ、オリーブ油、ラノリン、高級アルコール、脂肪酸、高級アルコールと脂肪酸の合成エステル油、シリコーン油等が挙げられ、保湿剤としてはソルビトール、キシリトール、グリセリン、マルチトール、プロピレングリコール、1,3-ブチレングリコール、1,4-ブチレングリコール、ピロリドンカルボン酸ナトリウム、乳酸、乳酸ナトリウム、ポリオキシプロピレン脂肪酸エステル、ポリエチレングリコール等が挙げられ、増粘剤としてはカルボキシビニルポリマー、カルボキシメチルセルロース、ポリビニルアルコール、カラギーナン、ゼラチン等の水溶性高分子、塩化ナトリウム、塩化カリウム等の電解質などが挙げられ、防腐剤としては尿素、メチルパラベン、エチルパラベン、プロピルパラベン、ブチルパラベン、安息香酸ナトリウム等が挙げられ、乳化剤としてはポリオキシエチレンアルキルエーテル、ポリオキシエチレン脂肪酸エステル、ポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル、グリセリン脂肪酸エステル、ポリグリセリン脂肪酸エステル、ポリオキシエチレングリセリン脂肪酸エステル、ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油、ポリオキシエチレンソルビトール脂肪酸エチレン等の非イオン界面活性剤が挙げられ、粉体としてはタルク、セリサイト、マイカ、カオリン、シリカ、ベンナイト、パーミキュライト、亜鉛華、雲母、雲母チタン、塩化チタン、酸化マグネシウム、酸化ジルコニウム、硫化バリウム、ベンガラ、酸化鉄、群青等が挙げられ、pH調整剤としては乳酸-乳酸ナトリウム、クエン酸-クエン酸ナトリウム等の緩衝剤が挙げられる。また、種々の有効成分としてアラントイン、ビタミンE誘導体、グリチルリチン、アスコルビン酸誘導体、コージ酸、アルブチン、パンテテイン酸誘導体、プラセンタエキス、抗炎症剤、ヨクイニン、各種植物抽出物質等を添加することにより、メラニン抑制効果の向上を図ることができる。更に、種々の紫外線の吸収又は反射物質を添加することにより、日焼けの予防効果と治療効果を増強する化粧料とすることもできる。

【0031】また、一般にその用量は、例えばクリーム状又は軟膏状の製剤の場合、皮膚面1cm²当たり1～

20mg、液状製剤の場合、同じく1～10mgとするのが好ましいが、これに限定されるものではない。

【0032】さらに、本発明化粧料は、化粧水、クリーム、乳液、パック等のフェーシャル化粧料やファンデーション、口紅、ほほ紅等のメーキャップ化粧料、シャンプー、リンス、養毛剤等の頭髮用化粧料、その他の化粧料に対して広範囲に適用できる。

【0033】さらにまた、本発明にかかる皮膚常在細菌の増殖因子及至皮膚有害細菌の生育阻害因子は、化粧料に限らず各種化学品や薬剤等の関連分野の製品に適用できる。

【0034】

【作用】本発明化粧料は、ヒトそれぞれによって異なっている皮膚細菌叢に対して、皮膚常在細菌を増殖・活性化し、皮膚有害細菌の生育を阻害するので、健全な皮膚細菌叢によって組成されるより自然に近い「皮脂層」を提供し得る。また、ヒトそれぞれ固有の皮膚細菌叢を増殖・活性化するので、外部から皮膚細菌を添加することと比較するとはるかに安全である。

【0035】この「皮脂層」は、皮膚を乾燥から守り、外部から加わる化学的・物理的な障害に対してバリア層として働き、また活性酸素や紫外線による障害を防御し、さらに皮膚有害細菌の生育を阻害する等の良好な皮膚保護作用・自浄作用を達成し、皮膚を美しく健全にすることができる。

【0036】

【実施例】つぎに、本発明を実施例によって説明するが、本発明はこれにより限定されるものではない。

【0037】まず、本発明にかかる皮膚常在細菌の増殖因子としての必須アミノ酸について述べる。

【0038】(1) 実験例-1〔皮膚常在細菌のアミノ酸要求性〕

健康成人の頬から分離したプロピオニバクテリウム・アクネス(以下「Pa」という)、プロピオニバクテリウム・グラニューロサム(Propionibacterium granulosum 以下「Pg」という)、スタフィロコッカス・エピデルミディス(以下「Se」という)のアミノ酸要求性を調べた結果を表1に示す。

【表1】

7
皮膚常在細菌のアミノ酸要求性

8

アミノ酸	Pa KS81	Pg NN48	Se YO67
アラニン(Ala)			
アルギニン(Arg)	E	E	E
アスパラギン(Asn)			
アスパラギン酸(Asp)			
システイン(Cys)			
グルタミン(Gln)			
グルタミン酸(Glu)			
グリシン(Gly)			
ヒスチジン(His)			
イソロイシン(Ile)	E	E	E
ロイシン(Leu)	E	E	E
リジン(Lys)			
メチオニン(Met)	E	E	
フェニルアラニン(Phe)	E	E	
プロリン(Pro)			E
セリン(Ser)			
スレオニン(Thr)			
トリプトファン(Trp)	E	E	E
チロシン(Tyr)	E	E	
バリン(Val)	E	E	E

E; 必須 (全アミノ酸含有培地37℃、48-72hr後の増殖 (OD₆₀₀値) の<25%)

Pa; プロピオニバクテリウム・アクネス, Pg; プロピオニバクテリウム・グラニューローサ
△, Se; スタフィロコッカス・エピデルミデイス, KS81, NN48, YO67; 菌株コード

全アミノ酸を含有する培地における「Pa」、「Pg」、及び「Se」の37℃、48時間から72時間での増殖率 (OD₆₀₀値) を100%とした場合に対し、それぞれのアミノ酸を欠乏させたときの増殖率が25%以下になった場合に、そのアミノ酸を必須アミノ酸と定義した。この実験結果から皮膚常在細菌の増殖因子としての必須アミノ酸は、アルギニン、イソロイシン、ロイシン、メチオニン、フェニルアラニン、プロリン、トリプトファン、チロシン、バリンであることが判明した。尚、メチオニン、フェニルアラニン、チロシンはブ
40
ロピオニバクテリウム属に必須で、プロリンはスタフィロコッカス属に必須であった。その他のアミノ酸は、ブ

ロピオニバクテリウム属及びスタフィロコッカス属に必須であった。

【0039】(2) 実験例-2 [必須アミノ酸の皮膚常在細菌増殖効果]

皮膚常在細菌の増殖因子としての必須アミノ酸をバランスよく含有する増殖因子源としてヒト角質由来のセラチンを使用し、皮膚常在細菌「Pa」、「Pg」、及び「Se」の増殖効果を確認した。ヒト角質由来のセラチンのアミノ酸組成は表2の通りで、トリプトファンを除く全ての皮膚常在細菌の必須アミノ酸をバランスよく含有している。

【表2】

ヒト角質由来のケラチンのアミノ酸組成

(残基/1000残基)

(皮膚常在細菌の必須アミノ酸)	
アルギニン	45
イソロイシン	46
ロイシン	93
メチオニン	5
フェニルアラニン	34
プロリン	29
トリプトファン	0
チロシン	20
バリン	57
(その他のアミノ酸)	
アラニン	71
アスパラギン酸	98
1/2システイン	29
グルタミン酸	158
グリシン	116
ヒスチジン	16
リジン	57
セリン	72
スレオニン	54

本実験例では、PYGブロス培地（培地組成（g／1）；トリブチケース 1、イーストエキス 0.2、グルコース 2、NaCl 2.5、 NaH_2PO_4 3、 K_2HPO_4 7、ツィーン80 5、システイン塩酸塩 0.2、pH6.8）を使用しているため、不足するトリプトファンは培地に加えるトリブチケース（トリプトファンを0.9%含有）とイーストエキス（トリプトファンを1.0%含有）から補充される。培地にケラチンを添加した場合と無添加の場合（対照）の各皮膚常在細菌の増殖の状況を図1に示す。ケラチンを添加すると、無添加の場合に比較して「Pa」、「Pg」、及び「Se」とともに明らかな増殖効果を示した。また、皮膚常在細菌の栄養源となるオリーブオイルを同量添加した場合と比較しても、「Pa」、「Pg」、及び「Se」の全ての増殖に対して、ケラチンは優れた増殖促進効果を示した。

【0040】また、本発明にかかる皮膚常在細菌の増殖因子としての高級脂肪酸について述べる。

【0041】（3）実験例-3〔ステアリン酸、オレイン酸の皮膚常在細菌増殖効果〕

PYGブロス培地（培地組成は実験例-2と同様）に各種高級脂肪酸を10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 添加し、37℃で48時

間培養した場合の、代表的な皮膚常在細菌である「Pa」の標準菌株ATCC 11827の増殖結果を図2に示す。各種高級脂肪酸の中で、ステアリン酸及びオレイン酸が明らかな「Pa」の増殖効果を示した。

【0042】つぎに、本発明にかかる皮膚有害細菌の生育阻害因子としての高級脂肪酸について述べる。

【0043】（4）実験例-4〔高級脂肪酸の皮膚有害細菌生育阻害効果〕

各種高級脂肪酸を5mg/mlから0.010mg/mlを段階的に添加したGAM寒天平板（74.0g/l中；ペプトン 10.0、ダイズペプトン 3.0、プロテオーゼペプトン 10.0、消化血清末 13.5、イーストエキス 5.0、肉エキス 2.2、肝臓エキス末 1.2、ブドウ糖 3.0、リン酸二水素カリウム 3.0、塩化ナトリウム 3.0、溶性デンプン 5.0、L-システイン塩酸塩 0.3、チオグリコール酸ナトリウム 0.3、寒天 15.0、pH7.1）に、皮膚有害細菌の代表的な細菌であるスタフィロコッカス・アウレウス（以下「Sa」という）を10⁸/ml菌液を画線塗布し、37℃で24時間好気培養し、その生育阻害効果を確認した結果を表3に示す。【表3】

スタフィロコッカス・アウレウス NN47

濃度 mg/ml	高級脂肪酸									
	12:0	14:0	16:0	16:1	18:0	18:1	18:2	18:3	20:0	20:4
5	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-
2.5	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-
1.25	-	-	+	-	+	+	+	-	+	+
0.625	-	+	+	-	+	+	+	-	+	+
0.313	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
0.156	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
0.078	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
0.039	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
0.020	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
0.010	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

スタフィロコッカス・アウレウス 671

濃度 mg/ml	高級脂肪酸									
	12:0	14:0	16:0	16:1	18:0	18:1	18:2	18:3	20:0	20:4
5	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-
2.5	-	-	+	-	+	+	-	-	+	-
1.25	-	-	+	-	+	+	-	-	+	-
0.625	-	-	+	-	+	+	-	-	+	-
0.313	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-
0.156	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
0.078	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
0.039	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
0.020	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
0.010	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

+ 増殖 - 増殖せず

GAM寒天平板に10⁸/ml菌液を画線塗抹、好気培養 (37℃ 24hr)

12:0 ラウリン酸、14:0 ミリスチン酸、16:0 パルミチン酸、16:1 パルミトレイン酸、

18:0 ステアリン酸、18:1 オレイン酸、18:2 リノール酸、18:3 リノレン酸、

20:0 アラキジン酸、20:4 アラキドン酸

各種高級脂肪酸の中で、ラウリン酸、ミリスチン酸、パルミトレイン酸、リノール酸、リノレン酸、アラキジン酸、アラキドン酸が2.5 mg/ml以下で「Sa」の生育阻害効果を示した。特に、ラウリン酸、パルミトレイン酸とリノレン酸が「Sa」の2菌株に対して、低濃度で生育を阻害した。

【0044】さらに、本発明にかかる皮膚常在細菌の栄養源としての皮脂成分、及び汗成分を添加した場合の皮膚常在細菌の増殖効果について述べる。

【0045】(5) 実験例-5〔皮脂成分及び汗成分の

皮膚常在細菌増殖効果〕

PYGブロス培地〔培地組成は実験例-2と同様〕に皮脂成分及び汗成分を表4の割合で添加し、無添加の場合と皮膚常在細菌の増殖効果を比較した結果、添加した場合は「Pa」の増殖促進率(コロニーの大きさで判断)が約20%、「Se」の増殖促進率が約30%上昇し、皮脂成分及び汗成分の皮膚常在細菌の増殖促進効果を示した。

【表4】

脂質の成分及び汗の成分

脂質の成分組成 (重量%)	
トリグリセリド	60
ワックスエステル	25
スクワレン	12
コレステロールエステル	2
コレステロール	1

汗の成分組成 99.5%は水 (汗100g中のmg)	
塩素	320
ナトリウム	200
カリウム	20
カルシウム	2
マグネシウム	1
窒素	16
アンモニア	5
ブドウ糖	2
乳酸	35

【0046】以上述べた皮膚常在細菌の増殖効果とそれに伴う活性化は、健全な皮膚細菌叢によって組成されるより自然に近い「皮脂層」を提供し、皮膚を乾燥から守り、外部から加わる化学的・物理的な障害に対してバリア層として働き、また活性酸素や紫外線による障害を防御し、さらに皮膚有害細菌の生育を阻害する等の良好な皮膚保護作用・自浄作用を達成し、皮膚を美しく健全にすることができる。

【0047】健全な皮膚細菌叢の皮膚保護作用・自浄作用のなかで、特に重要な活性酸素及び紫外線に対する防御作用について述べる。

【0048】活性酸素(O_2^-)等は、脂質等の過酸化、遺伝子の切断、蛋白変性等の原因となり、組織障害や老化促進因子のひとつと考えられている。特に皮膚表層は絶えず外気に接しているため、活性酸素が生じやすい環境にある。この皮膚表層に常在し生育する皮膚常在細菌は、スーパーオキシドディスムターゼ(以下SODという)やカタラーゼ等の酵素によって活性酸素を消去し*

※ていることが示された。

【0049】(6)実験例-6〔皮膚常在細菌のSOD活性の測定〕

皮膚常在細菌の代表である「Pa」と「Se」の菌体内及び菌体外に産生するSOD活性を測定した。SOD活性の測定はNBT還元法(新化学実験講座5「生体酸化・薬物代謝」東京化学同人;1992に準ずる)により行った。キサンチンにキサンチンオキシダーゼを作用させて恒常的に O_2^- を産生させる系にNBT(ニトロブルーテトラゾリウム)を入れると、NBTが O_2^- で還元されて発色し、これを波長560nmの吸光度で測定すると O_2^- の濃度が測定できる。従って、本実験例では皮膚常在細菌を入れない対照に比較して、吸光度の低下した程度でSOD活性が測定できる。実際に皮膚常在細菌の標準株で測定した菌体外産生SOD活性と菌体内SOD活性をそれぞれ表5、表6に示す。

【表5】

皮膚常在細菌標準株の菌体外産生SOD活性 単位: IU/ml

培養前 GAM	スタフィロカス・エビデミティスJAM12012 の培養上清			アロバネクトリウム・アクリ ATCC11827 の培養 上清 ×1
	×1/4	×1/2	×1	
0.00±0.08	0.14±0.01	0.23±0.09	0.48±0.10	0.01±0.06

【表6】

	スタフィロコッカス・エピデルミディス IAM12012	プロピオニバクテリウム・アクネス ATCC11827
菌体重量あたり (IU/mg菌体)	0.516±0.007	0.089±0.015
抽出蛋白量あたり (IU/mg蛋白)	31.4±0.4	15.4±2.6

皮膚に生育する「Se」は菌体外と菌体内にSOD活性 10* する。

を示した。「Se」に比較して深部に生育する「Pa」は菌体内にSOD活性を示した。このことは、多大な活性酸素の影響を受ける皮膚に生育する「Se」は、菌体外にもSODを産出して対応していることを示してい *

【0050】さらに健康人から分離した「Pa」10株と「Se」9株についてSOD活性を測定した結果を表7に示す。

【表7】

健康人分離株の菌体内・菌体外SOD活性測定

(n=3、各培養tubeにつき1回測定)

菌株コード	回収菌体 湿重 (mg/ml)	培養上清の SOD活性 (IU/mg菌体)	SOD抽出物		
			蛋白量 (mg/ml)	SOD活性 (IU/ml)	SOD活性 (IU/mg蛋白)
プロピオニバクテリウム・アクネス					
I①21	10.5±1.4	-0.24±0.08	1.37±0.02	7.0±1.0	5.1±0.6
Ⅶ①23	8.0±2.1	-0.38±0.28	0.35±0.02	3.0±0.3	8.6±0.7
I②21	6.9±0.4	-0.23±0.10	0.45±0.02	5.3±0.9	12.0±2.5
Ⅶ②25	17.2±0.8	-0.16±0.02	0.38±0.08	10.6±0.2	28.8±6.8
I③21C	15.0±1.5	-0.16±0.00	1.20±0.17	6.1±1.7	5.1±1.4
Ⅶ③21	8.3±1.1	-0.10±0.19	0.29±0.09	4.3±0.7	15.9±5.1
I④22	12.9±1.0	0.09±0.10	0.83±0.07	5.8±2.1	6.9±2.1
Ⅶ④21	10.8±0.7	-0.17±0.04	0.54±0.06	6.2±0.9	11.7±3.1
Ⅶ⑤21	15.5±6.6	-0.14±0.08	0.60±0.34	6.2±0.9	13.8±9.0
Ⅶ⑤22	13.5±1.4	-0.15±0.10	1.38±0.11	8.0±1.4	5.7±0.6
平均	11.9	-0.16	0.74	6.3	11.4
スタフィロコッカス・エピデルミディス					
I①33	4.4±0.3	1.06±0.09	0.72±0.16	81.9±8.0	118±33
Ⅶ①31	4.9±0.9	0.96±0.35	0.40±0.04	37.5±1.9	94±6
I②1	5.4±0.4	0.27±0.05	0.55±0.06	12.4±3.4	22±6
I②3	5.3±0.5	0.38±0.17	0.63±0.03	20.0±7.9	32±14
I③31	5.4±0.4	0.60±0.13	0.66±0.03	29.2±3.4	44±6
I④32	5.6±0.4	0.82±0.18	0.75±0.04	49.3±8.9	66±10
Ⅶ④26D	5.1±1.8	3.30±0.51	0.69±0.02	32.2±7.0	47±11
I⑤1	4.9±2.0	4.93±0.26	0.86±0.02	36.4±1.2	42±1
I⑤2	3.6±1.0	8.24±0.36	1.20±0.30	694±627	447±427
平均	5.0	2.28	0.72	99.2	101.3

皮膚に生育する「Se」は、皮膚表層深部に生育する「Pa」に比較して約10倍のSOD活性を示した。「Pa」のSOD活性には個人差があり、低い人で5.1 IU/mg蛋白、高い人で28.8 IU/mg蛋白であった。「Se」のSOD活性はさらに個人差が大きく、低い人で22 IU/mg蛋白、高い人で447 IU/mg蛋白であった。個人差は見られるが、SOD活性は標準株と同様な傾向を示した。

【0051】以上のことから、皮膚常在細菌は皮膚に障害を与える活性酸素を消去するSOD活性を有していることが判明し、また個人差(菌株の違い)があるところから皮膚常在細菌を活性化することの意義が示されるに至り、本発明にかかる皮膚常在細菌の増殖と活性化は皮膚を活性酸素の障害から防御する力を上昇させる効果を示したものと見える。

50 【0052】太陽光線中の紫外線は、UVA(長波長紫

17

外線)とUVB(中波長紫外線)、UVC(短波長紫外線)に分けられるが、UVCはオゾンや酸素に遮られて地表には到達しない。地表に到達する紫外線のひとつであるUVAは真皮まで浸透しシミやシワの原因になる。一方UVBは表皮に炎症を起こしシミやソバカス等の原因になる色素沈着を起こす。この皮膚に障害を起こし、さらに老化を促進する紫外線に対して、皮膚常在細菌は紫外線吸収作用によって紫外線による障害を防御していることを解明した。

【0053】(6)実験例-6〔皮膚常在細菌の紫外線吸収作用〕

皮膚常在細菌「Se」の菌体成分を希釈して菌体成分液(72.3mg/mlの原液を3,000倍に希釈して2.4μg/mlに調整)を作製し、サンスクリーンク*

菌体成分液とサンスクリーンクリームの紫外線吸収率

	%	
	UVA	UVB
菌体成分液	89	94
サンスクリーンクリーム	100	100

【0054】サンスクリーンクリームの場合は、時間の経過に伴って吸収効力が低下するが、皮膚表層に生育する皮膚常在細菌の場合は、絶えず増殖を繰り返し紫外線の障害から皮膚を防御している。本発明にかかる皮膚常在細菌の増殖と活性化は皮膚を紫外線の障害から防御す※

〔処方例1〕(化粧水)

グリセリン	3
ポリオキシエチレンモノオレート	1.5
エタノール	10
ピロリドンカルボン酸Na	2
香料	適量
セラチン	2
オレイン酸	2
ラウリン酸	2
トリグリセリド	3
乳酸-乳酸ナトリウム	0.5
精製水	残部
	100

【0057】

〔処方例2〕(クリーム)

ワセリン	4
セタノール	0.5
ソルビタンセスキオレート	2
液状ラノリン	4
固形パラフィン	4
ブチルパラベン	0.1
メチルパラベン	0.1
香料	0.2
セラチン	2

18

* リーム(市販サマータイム サンスクリーンフェイス; 成分 パラベン、セタノール、ステアリアルアルコール、酢酸トコフェロール、トリエタノールアミン、香料、アロエエキス)を同様に希釈(5,400倍に希釈調整)したものと、紫外線の吸収量を比較測定した。対照にしたサンスクリーンクリームは、SPF12(12倍線量照射で非塗布と同等の紅斑を生じる)である。菌体成分液とサンスクリーンクリーム液にそれぞれ紫外線を照射(東芝FL20S・E、距離25cm)し、その時のUVA及びUVBの紫外線吸収スペクトルを図3に、紫外線の吸収率を表8に示した。菌体成分液は、UVA及びUVBともにサンスクリーンクリーム液の90%前後の吸収率を示した。

【表8】

※る力を上昇させる効果を示したものといえる。

【0055】つぎに、本発明にかかる化粧料の処方例を例示するが、本発明はこれにより限定されるものではない。

【0056】

(重量%)

40

(重量%)

19
 オレイン酸
 バルミトレイン酸
 スクワラン
 コレステロールエステル
 乳酸
 精製水

2
 2
 10
 0.6
 1
 残部

100

(本処方例では、スクワレンが不飽和の炭化水素であるため、不安定で化粧料の原料としては使用しにくい。ため、スクワレンに水素を添加して安定化させた生物学的作用が同等なスクワランを処方した。)

【0058】〔試験例1〕上記各処方例につき(皮膚常在細菌の増殖因子を除外したものを対照として)0.2mlを基本寒天培地(φ3.5cmシャーレ;PUK培地からイーストエキス、システイン塩酸塩、さらにオレイン酸ナトリウムを除いた、トリブチカーゼ(BBC)1.5%、ハートエキス(日水)0.5%、グリセリン1%、食塩0.2%、 K_2HPO_4 0.2%、プロモクレゾールパープル0.002%、寒天1.5%、pH6.8、3ml)上に均等塗布吸収させた後、健康者頬部皮膚から採取した皮膚常在細菌懸濁希釈液を塗布し、嫌気性培養を行い、皮膚常在細菌のコロニーの生育の様子を数と大きさを比較検討した。

【0059】皮膚常在細菌の採取は、頬部の1cm²部位を生理食塩水に浸した滅菌綿棒で20回強く擦過し、希釈液(KH_2PO_4 0.5%、 Na_2HPO_4 0.4%、ツィーン800.1%、システイン塩酸塩0.03%、pH6.8、2ml)中に細菌を浮遊懸濁させる方法を用いた。細菌浮遊懸濁液はさらに10倍希釈法で2段階希釈し、各希釈率の液0.05mlを上記平板上に塗布し、37℃、4日間、嫌気グローブ箱培養(CO_2 :10%、 N_2 :80%、 H_2 :10%、スチールウール法)を行った。

【0060】増殖因子を欠く対照においては、皮膚常在細菌のコロニーがほとんど認められず、本発明にかかる皮膚常在細菌の増殖因子を有するものにあつては、10⁴から10⁶c.f.u./cm²(c.f.u.:colony forming unit)皮膚面積相当の増殖が見られ、さらに本発明にかかる増殖因子及び栄養源をバランスよく含有させたものにあつては、約1.8倍大きなコロニーが観察された。これ

20

らのコロニーは外観上均一で、生化学的性状検査(Bergey's Manual of Determinative Bacteriology)から、全てが「Pa」であつた。これと平行して、先の皮膚から採取した皮膚常在細菌希釈浮遊懸濁液を各種分離平板培地〔トリプトソイ寒天培地、マンニット食塩寒天培地(日水製薬)、ポテトデキストロース寒天培地(日水製薬)〕に塗布し、好気性培養(37℃、3~7日間)をしたところ、増殖因子を欠く対照においては、皮膚常在細菌のコロニーがほとんど認められず、本発明にかかる皮膚常在細菌の増殖因子を有するものにあつては、10⁴から10⁶c.f.u./cm²皮膚面積相当の増殖が見られた。さらに本発明にかかる増殖因子及び栄養源をバランスよく含有させたものにあつては、約1.5倍大きなコロニーが観察された。これらのコロニーは外観上均一で、生化学的性状検査(Bergey's Manual of Determinative Bacteriology)から、全てが「Se」であつた。以上の結果は、本試験の特性から皮膚常在細菌である「Pa」及び「Se」の増殖に対する、本発明にかかる皮膚常在細菌の増殖因子及び栄養源の増殖促進効果を示したものといえる。

【0061】〔試験例2〕実際に、皮膚常在細菌の増殖因子及び栄養源、さらに皮膚有害細菌の生育阻害因子を含有した化粧水及びクリームを毎朝洗顔後、継続使用したとき、顔面(頬部)の皮膚細菌叢と皮膚に与える影響をみた。健康な女性20名(19~59歳)のボランティア被験者を選び、頬部から試験例1と同様に皮膚細菌を採取し4週間にわたり皮膚細菌叢の分析を行った。また、これと平行して、皮膚細菌採取隣接部から脱脂綿棒にて皮脂を採取し、遊離脂肪酸につき、ガスクロマトグラフィー分析を行った。表9に化粧水及びクリーム使用に伴う皮膚細菌数の推移結果を示す。

【表9】

21
化粧水及びクリーム使用に伴う皮膚細菌数の推移
(被験者：健康女性20名、19歳から59歳の平均値)

22

細菌	検出コロニー数 (cfu/cm ²)		
	使用前	使用後2週	使用後4週
総菌数	5.2×10 ⁵	8.6×10 ⁵	9.3×10 ⁵
プロピオンバクテリウム・アクネ	5.2×10 ⁵	8.6×10 ⁵	9.3×10 ⁵
プロピオンバクテリウム・グラニューロム	検出限界以下	検出限界以下	検出限界以下
スタフィロコッカス・エピデルミシス	0.7×10 ⁴	1.0×10 ⁴	1.8×10 ⁴
スタフィロコッカス・キャピティス	1.1×10 ³	0.5×10 ³	0.1×10 ³
スタフィロコッカス・アウレウス	検出限界以下	検出限界以下	検出限界以下
マイココッカス	検出限界以下	検出限界以下	検出限界以下
ストレプトコッカス	検出限界以下	検出限界以下	検出限界以下
バクテリス	検出限界以下	検出限界以下	検出限界以下
イースト	検出限界以下	検出限界以下	検出限界以下

(注) 検出限界以下：<1×10²

【0062】使用開始後、総菌数は2週後で約1.7倍、4週後で約1.8倍と増加傾向を示したが、これは最優勢皮膚常在細菌「Pa」の増加傾向と一致している。この皮膚細菌数は、健康者の皮膚における正常域にあり、異常増殖を示すものではない。この増加傾向は、皮膚常在細菌「Pa」の増殖が促進されたことを示したものといえる。

【0063】次優勢細菌である「Se」は、2週後で約1.4倍、4週後で約2.6倍と「Pa」と同様な増加傾向を示した。この「Se」の菌数も、健康者の皮膚に*

*における正常域にあり、異常増殖を示すものではない。この増加傾向は、皮膚常在細菌「Se」の増殖が促進されたことを示したものといえる。

【0064】スタフィロコッカス・キャピティス (Staphylococcus capitis)は少数検出されたが、減少傾向を示した。この試験では、その他の皮膚細菌については選択平板培地上にほとんど検出されなかった。

【0065】表10には、化粧水及びクリーム使用による遊離脂肪酸組成推移を示している。

【表10】

化粧水及びクリーム使用に伴う皮膚遊離脂肪酸の推移
(被験者：健康女性20名の平均値)

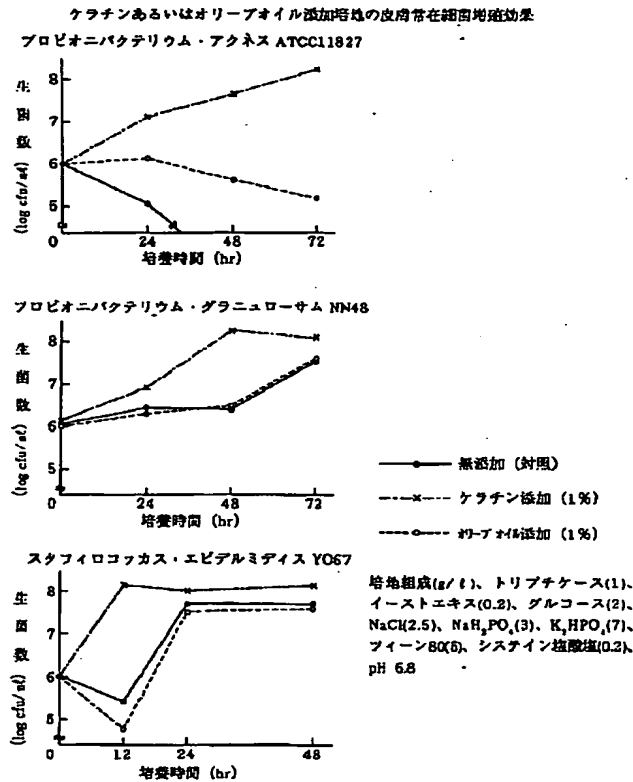
皮膚遊離脂肪酸	遊離脂肪酸に対する割合		
	クリーム使用前	使用後2週	使用後4週
総遊離脂肪酸	100%	100%	100%
ラウリン酸(C12:0)	3	3	5
ミリスチン酸(C14:0)	9	7	7
パルミチン酸(C16:0)	40	35	26
パルミトレイン酸(C16:1)	9	16	18
ステアリン酸(C18:0)	20	20	22
オレイン酸(C18:1)	11	12	14
リノール酸(C18:2)	1	1	—
リノレン酸(C18:3)	—	—	—
アラキジン酸(C20:0)	1	1	1
アラキドン酸(C20:4)	6	5	7

遊離脂肪酸組成は、採取した皮脂をTLCで分離し、メチル化後、ガスクロマトグラフィーにより分析した。この試験では、ラウリン酸(C12:0)からアラキドン酸(C20:4)までの遊離脂肪酸の総量には個人差が

認められ、少ない人で20.8ng/cm²、多い人で137.8ng/cm²であった。総遊離脂肪酸量に占める各種遊離脂肪酸の割合は、使用後、パルミチン酸(C16:0)は減少傾向を示し、パルミトレイン酸

(C16:1)とオレイン酸(C18:1)が増加傾向を示した。しかし、これらの変化こそ増殖した皮膚常在細菌のリパーゼ活性の指標であり、パルミトレイン酸が皮膚有害菌の「Sa」の生育を低濃度で阻害すること(表3)、また、オレイン酸が「Pa」及び「Se」の生育を促進することを考えると、皮膚常在細菌が「皮脂層」形成において皮膚常在細菌と皮膚との間に存在するエコシステムの恒常性維持に積極的に関与している結果*

【図1】.



*と評価することができる。

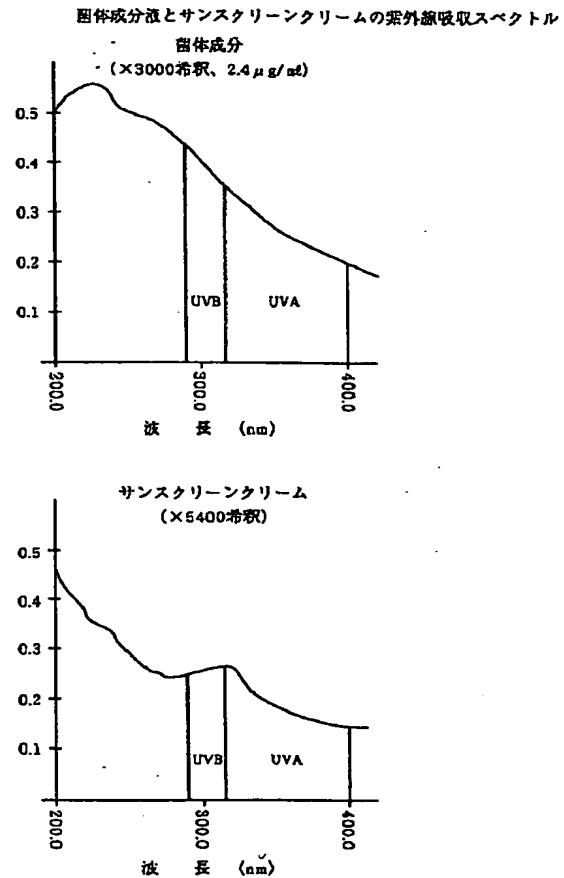
【図面の簡単な説明】

【図1】ケラチンあるいはオリーブオイル添加培地の皮膚常在細菌増殖効果を示すグラフ。

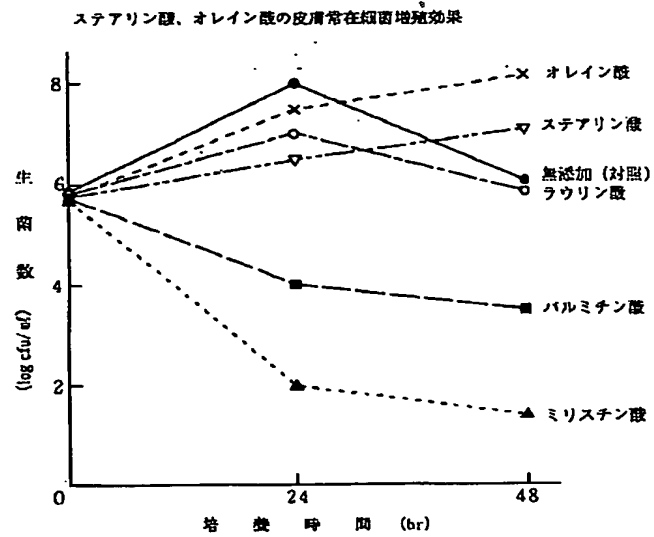
【図2】ステアリン酸、オレイン酸の皮膚常在細菌増殖効果を示すグラフ。

【図3】菌体成分液とサンスクリーンクリームの紫外線吸収スペクトルを示すグラフ。

【図3】



【図2】



皮膚常在細菌：プロピオニバクテリウム・アクネス ATCC11827
 PYGブロス培地に脂肪酸を添加 (10 μ g/ml)、37℃で嫌気培養